



(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68, C12N 15/11, C12M 1/32, G01N 33/58	A1	(11) 国際公開番号 WO99/06591 (43) 国際公開日 1999年2月11日(11.02.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03413 (22) 国際出願日 1998年7月30日(30.07.98) (30) 優先権データ 特願平9/206602 1997年7月31日(31.07.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 理化学研究所(THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH)[JP/JP] 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama, (JP) (71) 出願人 ; および (72) 発明者 林崎良英(HAYASHIZAKI, Yoshihide)[JP/JP] 〒305-0074 茨城県つくば市高野台三丁目1-1 理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター内 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 弁理士 塩澤寿夫, 外(SHIOZAWA, Hisao et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: METHODS FOR DETECTING MUTATION IN BASE SEQUENCE (54)発明の名称 塩基配列中の変異を検出する方法 (57) Abstract A method for detecting a mutated nucleic acid and/or DNA fragment which comprises hybridizing a nucleic acid fragment, etc. immobilized on a plate with another nucleic acid fragment, etc. to be examined in the presence of the mutation, binding the thus formed inappropriate base pair to a substance capable of binding specifically to the inappropriate base pair, such as labeled Mut S, and then detecting and identifying the fragment to which the above substance has been bound; a method which comprises treating, in place of the above substance capable of binding specifically to the inappropriate pair, an inappropriate base pair formed between hybridized fragments with a substance capable of specifically recognizing and cleaving the inappropriate base pair, thus cleaving or removing the hybridized fragment starting with the inappropriate base pair, labeling the fragment remaining on a plate after the cleavage or removal, and then detecting and identifying the thus labeled fragment; and substances capable of binding specifically to an inappropriate base pair such as GFP-labeled Mut S. Thus, structural mutations in two or more genes can be detected in parallel. In particular, structural mutations can be detected while monitoring the extent of expression simultaneously.		

(57)要約

核酸断片等を固定した基板上の前記断片と、変異を検定すべき核酸断片等とをハイブリダイズさせて生じた不適正塩基対に、標識された Mut S のような不適正塩基対に特異的に結合する物質を結合させ、前記物質が結合した断片を検出することにより同定する、変異を有する核酸及び／又は PNA 断片を検出する方法。不適正塩基対に特異的に結合する物質の代わりに、ハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対を特異的に認識切断する物質を作用させて、不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片を切断または切除し、切断または切除後に基板上に残った断片を標識し、標識された断片を検出することにより同定することもできる方法、並びに GFP 標識されている Mut S のような不適正塩基対に特異的に結合する物質を開示する。本発明によれば、複数の遺伝子の構造変異を並行して検出することが可能であり、特に、発現量を同時にモニターしながら、その構造変異を検出することが可能である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ			TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明細書

塩基配列中の変異を検出する方法

発明の属する技術分野

本発明は、不適正塩基対を検出することによる塩基配列中に存在する変異（塩基置換）を検出する方法に関する。さらに本発明は、塩基配列中に存在する変異を検出すると同時に変異を有する遺伝子の発現量も検出できる方法に関する。

背景技術

医学生物学の分野において、遺伝子の発現量及びその変異について検出する手法は、未知の遺伝子同定や疾病の診断に非常によく使われている重要な手法である。この発現遺伝子を検出する手法は2種に大別できる。1つは cDNA の視覚化の方法であり、他の1つは既にゲノム解析で単離された cDNA を基板上にはりつけ、ハイブリダイゼーションによって検出するマイクロアレイの手法である。

まず第1のグループである cDNA の視覚化手法であるが、Differential display 法 (Liang, P. and Pardee, A. Science 257, 967-971)、分子索引法 (Molecular indexing (Bernner, S. and Livak, K. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8902-8906 (1989))、RLCS (restriction landmark cDNA scanning (Suzuki, H. et al. Nucleic Acid Res. 24, 289-294 (1996)) のような方法が報告されている。これらの方法は、電気泳動により DNA 断片を分離検出している為、その際 SSCP 法 (Orita, M. et al. K. Genomics 5, 874-879 (1989))、DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法 (Myers, R. M. et al. Method Enzymol. 155, 501-517 (1987)) 等を用いて、DNA 断片上の塩基置換を検出することができる。すなわち DNA の多型を検出し、連鎖解析法や突然変異の直接的検出に用いることができる。

一方、最近の急速なゲノム科学の進歩により、発生段階を含め、全てのステージ及び全ての組織で部分的ではあるが cDNA (EST) が大量に単離され、塩基配列が決定されている。また、最近では完全長 cDNA ライブラリーを用いた遺伝子全長の構造が決定されつつあり、それがデータバンクとクローンバンクという形で蓄積されつつある。この cDNA プロジェクトから得られた大量のクローンを用いる、cDNA マイクロアレーエクスプレッションモニタリング (Schena, M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 10614-10619 (1996)) という手法が報告されている。この手法では、上記クローンに該当する遺伝子の発現を、基板上に固定した cDNA と検体から取られた mRNA を逆転写反応で標識したプローブとを用いてハイブリダイズすることで、検出する。この方法は、単離された cDNA (EST) 全てについて、アッセイが可能であり、ゲノム情報及びゲノムバンクのサイズが拡大しても、単離された DNA 断片 (cDNA (EST)) 全てについて測定することができる。また、PCR に依存しない手法である為、シグナル強度が遺伝子の発現量と対応する。

上記に挙げた 2 つのグループの手法のうち、cDNA の視覚化手法には次のような欠点がある。これらの方法で視覚化されたシグナルがどの遺伝子であるかという情報が整備されておらず、興味あるシグナルを検出した後、そのシグナルからそれに該当する DNA 断片を単離回収しなくてはならない。また、発現している遺伝子をどの程度まで検出できるかという感度は、各々の手法の原理に依存している。特に Differential display 法や分子索引法 (Molecular indexing) のように PCR を用いている場合は、感度は良いが、発現量の検出に PCR のバイアスがかかり、発現量の少ない配列については検出されない場合があり、正確な発現量をモニターすることができない。一方、RLCS 法のような PCR を用いない手法では、シグナルの強さが発現量をモニターしてはいるが、感度が悪く全ての遺伝子をシグナルとして検出しているとは言い難い。

一方、マイクロアレーハイブリダイゼーション法に関しては、ハイブリダイゼーションによりシグナルを検出している為に、点変異などの小さな塩基配列の相違を検出することができないという欠点がある。

そこで本発明の目的は、蓄積されつつあるゲノム情報、ゲノムクローンの資源を利用して、複数の遺伝子の構造変異を並行して検出可能な方法、特に、発現量を同時にモニターしながら、その構造変異が検出可能である方法を提供することにある。発現量のモニターとその構造変異（塩基置換）を同時に検出することが可能であることにより、既知のゲノム情報を利用して、どの遺伝子に構造変異（塩基置換）が起きているかを迅速に判定することが出来る。

さらに本発明の目的は、上記方法に使用するための試薬及び装置を提供することにある。

発明の要旨

本発明は、(A) 1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上のPNA断片からなる群から選ばれる1種または2種以上の断片を固定した基板上的前記断片の少なくとも1つと、1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上のPNA断片からなる群から選ばれる少なくとも1種の変異を検定すべき断片とをハイブリダイズさせる工程、

(B) ハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識された物質を結合させる工程、

(C) 前記物質が結合した断片を、前記標識を検出することにより同定する工程を含む、変異を有する核酸及び／又はPNA断片を検出する方法。

(以下第1の検出方法という) に関する。

さらに本発明は、(A) 1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上

の PNA 断片からなる群から選ばれる 1 種または 2 種以上の断片を固定した基板上の前記断片の少なくとも 1 つと、1 種または 2 種以上の核酸断片及び 1 種または 2 種以上の PNA 断片からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の変異を検定すべき断片とをハイブリダイズさせる工程、

(D) ハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対を特異的に認識切断する物質を作用させて、不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片を切断するか、または不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片の一方の断片の少なくとも一部を切除する工程、

(E) 切断または切除後に基板上に残った断片を標識する工程、

(F) 標識された断片を、前記標識を検出することにより同定する工程

を含む、変異を有する核酸及び／又は PNA 断片を検出する方法。

(以下第 2 の検出方法という) に関する。

加えて本発明は、不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識されていることを特徴とする物質に関する。

また、本発明は、基板の表面に 1 種又は 2 種以上の RNA 断片又は PNA 断片をハイブリダイゼーション可能な状態で固定したことを特徴とする物品に関する。

図面の簡単な説明

図 1 は、MutS-GFP 融合タンパク質・発現プラスミドの構築法を示す。

図 2 は、実施例 3 で得られた DNA チップのオートラジオグラフィーの結果を示す。

発明の実施の形態

以下本発明について説明する。

工程 (A)

本発明の第 1 及び第 2 の検出方法ともに、「1 種または 2 種以上の核酸断片及び 1 種または 2 種以上の PNA 断片からなる群から選ばれる 1 種または 2 種以上の断片を固定した基板」を用いる。上記核酸断片とは、DNA 断片及び RNA 断片を含み、基板に固定される断片は、単一（1 本）の核酸断片または単一（1 本）の PNA 断片であることができる。また、複数本の核酸断片及び／又は PNA 断片が基板に固定されいてもよく、その場合、基板に固定される断片は、配列及び／又は鎖長の異なる 2 種以上の DNA 断片、RNA 断片又は PNA 断片であることができる。さらに、基板には、DNA 断片及び RNA 断片、DNA 断片及び PNA 断片、RNA 断片及び PNA 断片、または DNA 断片及び RNA 断片及び PNA 断片が混在していてもよく、その場合、各断片は、配列及び／又は鎖長の異なる断片であることができる。

基板に固定される DNA 断片、RNA 断片及び PNA 断片等の断片は、塩基配列を持つ、分子であるならば特に制限はない。また、目的とする DNA が遺伝子の転写体である cDNA であっても、ゲノム DNA であっても特に制限はない。遺伝子完全長の cDNA の一部または全部の配列を有する DNA 断片であっても良い。

DNA 断片を基板上に固定したものは、例えば、DNA チップとして知られている。cDNA を固定したマイクロアレーチップ及びこれを用いた転写産物発現量の測定法は公知である。本発明の方法は、マイクロアレーチップによる転写産物発現量と、その測定方法では検出できない不適正塩基対の発現量とを、同時に検出することに特徴がある。後述のように、転写産物発現量を計測するシグナルと異なったシグナルで不適正塩基対の発現量を計測することにより、双方の情報を同時に検出することができる。

基板に固定される核酸材料としては、より具体的には、例えば、完全長 cDNA や EST（cDNA の一部）またゲノム DNA 等を挙げることができ、これらは、公知の方法を用いて調製することができる。ゲノム DNA としてプラスミド、ファージ、PAC、

BAC、YAC等を挙げることができる。

上記完全長 cDNA や EST またゲノム DNA 等は、公知の方法で切り出し、基板上に固定することができる。特に基板への固定は、DNA 断片の 5'、3'端等の一点により基板と結合し、塩基配列の部分が固定されないようにすることが好ましい。ハイブリダイズした部分が基板から離れているため検出しやすいという利点がある。DNA の基板上への具体的な固定方法は、例えば、共有結合させること(例えば、Chrissey, L. A. et al. Nucleic Acid Res. 24, 3031-3039 (1996), Timoffev, E. N. et al. Nucleic Acid Res. 24, 3142-3148 (1996)に記載の方法)が好ましいが、必ずしも固定方法に制限はない。

基板の表面に 1 種又は 2 種以上の RNA 断片又は PNA 断片をハイブリダイゼーション可能な状態で固定した物品はこれまで知られておらず、本発明はこれらの物品を包含する。前記 RNA 断片又は PNA 断片は、その 5'または 3'端においてのみ基板と結合することで基板に固定され、その結果、ハイブリダイゼーション可能な状態で固定される。また、断片の基板への固定は、例えば、RNA 断片又は PNA 断片の末端を、必要により化学修飾し、基板上に存在する水酸基等の反応性基と反応させることで、共有結合させることで行うことができる。基板となるものの材質や寸法には特に制限はなく、操作の簡便性等を考慮してチップ状やフィルター状とすることができる。

本発明の方法では、1つの基板に、配列が既知の複数の核酸断片及び／又は PNA 断片を複数個固定しておくことで、配列の異なる核酸断片及び／又は PNA 断片について同時に(並行して)変異を検出することができるという利点がある。固定する断片の個数には特に制限はない。

一方、変異を検定すべき断片は、1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上の PNA断片からなる群から選ばれる少なくとも1種である。変異を検定

すべき断片についても、基板に固定される断片と同様に、単一（１本）の核酸断片または単一（１本）の PNA 断片であることができる。また、複数本の核酸断片及び／又は PNA 断片であってもよく、その場合、変異を検定すべき断片は、配列及び／又は鎖長の異なる２種以上の DNA 断片、RNA 断片又は PNA 断片であることができる。さらに、DNA 断片及び RNA 断片、DNA 断片及び PNA 断片、RNA 断片及び PNA 断片、または DNA 断片、RNA 断片及び PNA 断片が混在していてもよく、その場合、各断片は、配列及び／又は鎖長の異なる断片であることができる。

これら変異を検定すべき断片（プローブ）は、例えば、遺伝子転写産物である mRNA や cDNA、ゲノム DNA、インビトロで転写（in vitro transcription）された RNA 及び／又は PNA であることができる。但し、これらに限定されない。

例えば、変異と発現量を検出すべき断片が cDNA 断片である場合、目的の発現時期、発現組織から mRNA を単離し、第 1 鎖完全長 cDNA を合成する方法によりこの cDNA の第 1 鎖に標識を入れることができる。ハイブリダイズさせる断片の標識は、後述のように蛍光、リン光、発光、安定同位元素、放射性物質等を用いることができる。但し、以下に述べる不適正塩基対認識物質と異なる標識物質、方法を取ることが、発現量と不適正塩基対量を同時に検出できるので望ましい。標識されたプローブを調製し、核酸を固定した基板に反応させハイブリダイズ分子を作る。標識は、蛍光物質（ローダミン系またはフルオレセン系）で行ってもよいし、また ^{32}P 、 ^{35}S の様な放射性同位元素を用いて、既知の方法により標識してもよい。

基板に固定された断片と変異を検定すべき断片とのハイブリダイズは、常法により行うことができる。

工程（B）

本発明の第 1 の検出方法における工程（B）では、上記工程（A）においてハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対に特異的に結合する

物質であって、標識された物質を結合させる工程である。

基板に固定された断片と変異を検定すべき断片は、この断片の塩基配列と相同性の高い塩基配列を有する基板に固定された断片とハイブリダイズする。そして、変異を検定すべき断片に塩基置換（変異）が存在すると、ハイブリダイズした断片間に不適正塩基対が生じる。

工程（B）では、この不適正塩基対に、不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識された物質を結合させる。「不適正塩基対に特異的に結合する物質」としては、例えば、ミスマッチ結合タンパク質を挙げることができる。さらに、ミスマッチ結合タンパク質としては、例えば、大腸菌や酵母菌等の微生物由来のミスマッチ結合タンパク質やヒト等の動物由来のミスマッチ結合タンパク質を挙げることができる。具体的には、大腸菌由来のミスマッチ結合タンパク質として、Mut S タンパク質またはその類似体を例示することができ、前記類似体として *S. cerevisiae*（酵母）由来のミスマッチ結合タンパク質である MSH1 や MSH2、さらに、ヒト由来のミスマッチ結合タンパク質である hMSH2 を挙げることができる。また、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 由来のミスマッチ結合タンパク質として下記の C/C ミスマッチ結合タンパク質を挙げることができる。

Mut S は大腸菌の複製ミス修復する一群のタンパク質の一つであり、不適正塩基対の部分の特異的に認識して結合する (Su, S-S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, pp. 5057-5061 (1986))。また、Mut S タンパク質の類似体としては、上記以外に、例えば、Fleck, O. et al. Nucleic Acids Res., 1994, Vol. 22, No. 24, 5289-5295 に記載されたシゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 由来の T/G 結合活性を有するミスマッチ結合タンパク質を挙げることができる。このタンパク質は、T/G 結合活性以外に T/C, C/T, T/T, T/—, A/—, C/—, G/—, G/G, A/A, A/C, A/G, G/T, G/A 及び C/A 結合活

性も有する。C/C mismatches 結合タンパク質としては、例えば、Fleck O. et al. Nucleic Acids Res., 1994, Vol. 22, No. 24, 5289-5295 に記載されたシズサッカロミセス (Schizosaccharomyces) 由来の C/C 結合活性を有する mismatches 結合タンパク質を挙げることができる。このタンパク質は、C/C 結合活性以外に T/C, C/T, C/A, A/C, C/- 結合活性も有する。

mismatches 結合タンパク質の結合親和性は、不適正塩基対の種類によって異なることが知られている。例えば、Mut S タンパク質の場合、G/T mismatches や G A mismatches などは検出し易いが、特に C/C mismatches については結合親和性が弱く、見落とす可能性がある。一方、C/C mismatches 結合タンパク質は、逆に C C mismatches に高い結合親和性を持つので、すべての一塩基 mismatches は、両タイプの酵素で基本的には充分検出可能である。

さらに、上記不適正塩基対に特異的に結合する物質は、例えば、発光タンパク質、リン光タンパク質、蛍光タンパク質、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の物質で標識される。発光タンパク質としては、例えば、GFP (Green Fluorescence Protein) を挙げることができる。抗体としては、例えば、Mut S タンパク質に対しては抗 Mut S 抗体を挙げることができる。また、抗原(タグ)としては、His タグ、チオレドキシントグ、HA(赤血球凝集)タグ、myc タグ等を挙げることができる。尚、チオレドキシントグに対しては、抗チオレドキシントグ抗体を用い、HA タグ及び myc タグに対してはそれぞれ抗 HA 及び抗 myc 抗体を用いることができる。また、ビオチンに対してはタンパク質として (ストレプト) アビジンを挙げることができる。さらに、酵素としては、アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼ、エクオリン (aequorin) 等を挙げることができる。

また、標識の付し方は、標識の種類に応じて適宜選択でき、例えば、標識物質

が、発光タンパク質、リン光タンパク質、蛍光タンパク質、酵素及びタンパク質等の場合、融合タンパク質として用いることができる。また、標識物質が、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体及び抗原の場合、公知の化学反応又は酵素反応を用いて標識を付すことができる。

発光タンパクである Green Fluorescence Protein (GFP) はいかなる補助物質も必要とせず、このタンパク単独で ATP を消費して発光する物質である。比較的大きな 25 kDa の分子量を持つタンパクであるが、Mut S の遺伝子とコドンフレームを合わせて融合タンパク質を作製し、発光現象を用いて不適正塩基対を検出することができる。本融合タンパク質は不適正塩基対部位を検出するのに非常に有用でマイクロチップ上で使用する用途に限定されるものではない。

尚、本発明は、上記「不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識された物質」を包含する。

工程 (C)

本発明の第 1 の検出方法における工程 (C) では、前記標識を有する物質が結合した断片を、前記標識を検出することにより同定する。標識の検出は、標識の種類により適宜選択できる。例えば、発光タンパク質、リン光タンパク質、蛍光タンパク質、発光物質、蛍光物質、リン光物質等で標識した場合、発光、蛍光、またはリン光を、適当な検出器により検出する。また、安定同位元素、放射性物質で標識した場合には、放射線量を適宜検出することができる。抗体または抗原で標識した場合、抗原または抗体を用いて検出する。ビオチンを用いた場合、アビジンを用いて検出することができる。さらに、酵素で標識した場合、適当な基質を選択することで、反応生成物として発光性の物質を生成させることができる。基質としては、例えば、アルカリフォスファターゼの場合、適当な化学発光基（例えば、塩素置換 1,2-dioxetane）を有する化学発光基質を挙げることができ、ルシフェラーゼの場合

合、ルシフェリンを挙げることができる。

本発明の第1の検出方法においては、不適正塩基対に特異的に結合する物質が結合した断片を、その標識を検出することにより、不適正塩基対を生じた断片として同定することができる。

さらに本発明の第1の検出方法においては、変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片にも標識を導入し、かつ変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片の標識を検出することにより、不適正塩基対を生じた断片の同定に加えて定量も行うことができる。

変異を検定すべき核酸及び／又はPNAに対する標識は、例えば、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質で行うことができる。その具体例は、前記不適正塩基対に特異的に結合する物質の説明で挙げたものと同様である。

さらに、変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片に導入された標識を、不適正塩基対に特異的に結合する物質の標識とは、得られるシグナルが異なる物質とすることにより、不適正塩基対を生じた断片の同定と定量とを並行して行うことができる。即ち、並行して得られる変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片の発現量の結果、及び不適正塩基対を生じた断片の同定及び定量結果から、ハイブリダイズした断片中に含まれる不適正塩基対分子の比率を算出することができる。より具体的には、変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片に導入された標識から得られるシグナル等の強度（例えば、発光強度等）と不適正塩基対に特異的に結合する物質に導入された標識から得られるシグナル等の強度（例えば、発光強度等）を測定し、それぞれ、予め作成しておいた検量線等と対比することにより、変異を検定すべき核酸が遺伝子であればその発現量と、不適正塩基対を生じた断片の比率を定量することができる。

基板上で形成されたハイブリッド分子の不適正塩基対をプローブと別の物質により標識された不適正塩基対と特異的に結合する物質により検出する。例えば、GFPを用いて MutS を標識し、それとは異なる蛍光物質でプローブを標識した理由は、非励起下におけるシグナルは MutS のシグナルであり、レーザーで励起時のシグナルはプローブを標識したシグナル蛍光と GFP の発光シグナルの総和であり、また、蛍光物質の蛍光波長域が GFP の可視光線域と異なる場合には、分光によりその強度比を得ることができる。

不適正塩基対のシグナルの強さは測定すべき cDNA (転写物) の全体における発現頻度により変化する。しかし、本発明の方法では発現量の計測と同時に不適正塩基対のシグナルを同一基板上で測定できるため、その比を取ることで確実に塩基の点変異を検出することができる。

特に基板上に固定した完全長 cDNA の場合には、その遺伝子における変異が転写単位のいかなる部位にあっても検出することができるため、表現形質を支配する原因遺伝子の探索やガンにおける変異を検出するのに極めて有効な方法である。また、この不適正塩基対の情報を遺伝子の塩基配列上の多型 (原因遺伝子の突然変異も含む) ととらえて、連鎖解析を行えば、高等動植物の家系解析に応用することもできる。

工程 (D)

本発明の第 2 の検出方法における工程 (D) では、ハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対を特異的に認識切断する物質を作用させて、不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片を切断するか、または不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片の一方の断片の少なくとも一部を切除する。不適正塩基対を特異的に認識切断する物質としては、例えば、ヌクレアーゼを挙げることができる。また、ヌクレアーゼとしては、Mung bean ヌクレアーゼ、S1 ヌク

レアーゼ、RNase I 等を例示することができる。

不適正塩基対の検出時には、検出すべき不適正塩基対の種類により、検出物質を選択する必要がある。例えば、前記 MutS や C/C ミスマッチ結合タンパク質は点変異等の不適正塩基対を検出し易いが、欠失、挿入がある場合、結合せず見落とす場合が多い。また、前述のように、点変異においても不適正塩基対の種類によりミスマッチ結合タンパク質の検出感度は変化する。例えば、MutS の場合、G/T ミスマッチや G/A ミスマッチなどは検出し易いが、特に C/C ミスマッチに対しては結合アフィニティーが弱い。一方、C/C ミスマッチ結合タンパク質は C/C ミスマッチに対する結合アフィニティーは高く検出し易いが、G/T ミスマッチや G/A ミスマッチなどは見落とし易い。

そこで、本発明の第 2 の検出方法においては、工程 (D) で、ハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対を特異的に認識切断する物質を作用させて、不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片を切断し、工程 (E) で切断または切除後に基板上に残った断片を標識する方法を採用する。Mung bean スクレアーゼ、S1 スクレアーゼ、RNase I 等の不適正塩基対を切断する酵素を用いて、切断または切除した後に標識することで、1 塩基ミスマッチの場合も含めて欠失や挿入等の変異に起因する不適正塩基対がある場合でも検出することができるという利点がある。

工程 (E)

本発明の第 2 の検出方法の工程 (E) では、工程 (D) で切断または切除後に基板上に残った断片を標識する。工程 (E) における、断片の標識は、例えば、標識された基質を用いた酵素反応により行うことができる。酵素反応としては、ポリメラーゼ反応、カイネーション反応、ライゲーション反応、または 3' 付加反応を用いることができる。さらに、酵素反応として 3' 付加反応を用いる場合、基板上に

固定された断片の 3' 末端は、基板上に固定する前、ハイブリダイゼーション前、またはハイブリダイゼーション後、標識の付加前に、ブロックしておくことが、切断または切除された断片にのみ 3' 付加反応により標識を選択的に導入するという観点から適当である。上記ブロックは、例えば、末端にターミナルトランスフェラーゼ等を用いてジデオキシヌクレオチドを導入することにより行うことができる

酵素反応に用いられる基質の標識物質としては、例えば、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の物質を挙げることができる。その具体例は、前記不適正塩基対に特異的に結合する物質の説明で挙げたものと同様である。

工程 (F)

本発明の第 2 の検出方法の工程 (F) では、標識された断片を、前記標識を検出することにより同定する。標識の検出は、標識の種類により適宜選択でき、その具体例は、本発明の第 1 の検出方法の工程 (C) で説明したものと同様の手法を用いることができる。

本発明の第 2 の検出方法においては、工程 (E) においてなされた標識を検出することにより、不適正塩基対を生じた断片を同定することができる。

さらに本発明の第 2 の検出方法においては、変異を検定すべき核酸及び／又は PNA の断片にも標識を導入し、かつ変異を検定すべき核酸及び／又は PNA の断片の標識を検出することにより、不適正塩基対を生じた断片の同定に加えて定量も行うことができる。

変異を検定すべき核酸及び／又は PNA に対する標識は、例えば、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の物質で行うことができる。その具体例は、前記不適正塩基対に特異的に結合する物質の説明で挙げたものと同様である。

さらに、変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片に導入された標識を、工程（E）において断片に付与される標識とは、得られるシグナルが異なる物質で行うことにより、不適正塩基対を生じた断片の同定と定量とを並行して行うことができる。即ち、並行して得られる変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片の発現量の結果、及び不適正塩基対を生じた断片の同定及び定量結果から、ハイブリダイズした断片中に含まれる不適正塩基対分子の比率を算出することができる。より具体的には、変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片に導入された標識から得られるシグナル等の強度（例えば、発光強度等）と工程（E）において断片に付与される標識から得られるシグナル等の強度（例えば、発光強度等）を測定し、それぞれ、予め作成しておいた検量線等と対比することにより、変異を検定すべき核酸が遺伝子であればその発現量と、不適正塩基対を生じた断片の比率を定量することができる。

本発明によれば、蓄積されつつあるゲノム情報、ゲノムクロンの資源を利用して、複数の遺伝子の構造変異を並行して検出可能な方法、特に、発現量を同時にモニターしながら、その構造変異を検出することができる新規な方法を提供することができる。さらに、本発明の方法によれば、発現量のモニターとその構造変異（塩基置換）を同時に検出することが可能であることにより、既知のゲノム情報を利用して、どの遺伝子に構造変異（塩基置換）が起きているかを迅速に判定することが出来る。

さらに本発明は、上記方法に有用な不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識されている物質、及び基板の表面にRNA断片又はPNA断片をハイブリダイゼーション可能な状態で固定した物品も提供する。

本発明の方法によれば、発現の頻度情報と多型もしくは変異による不適正塩基対の情報が同一基板上で得られるという利点がある。

さらに、本発明の方法を利用すると、複数の個体に由来する複数の遺伝子中に存在する不適正塩基対(多型)を検出することにより、生物の家系について連鎖解析を行なうことができる。また、同一の発現形質を有する複数の個体に由来する複数の遺伝子の混合物の不適正塩基対を検出して、最も不適正塩基対を生じる遺伝子配列を特定することにより、前記発現形質の原因となる遺伝子配列を探索することもできる。

実施例

以下、実施例により、本発明を更に詳しく説明する。

実施例 1

固定化する DNA は TSH β プラスミド (Hayashizaki, Y. et al. FEBS Lett. 188 (1985) 394-400) から調製した。すなわち、プラスミドベクター (pBluescriptII のクローニングサイト、SstI、NotI にヒト TSH β cDNA を挿入したもの) 10 μ g を、SstI、NotI で切断後、アガロース電気泳動で分画し、精製した結果、TSH β cDNA、1 μ g を得た。

この TSH β cDNA の 3' 末端に以下のようにアミノ基を導入した。

TSH β DNA	1 μ g
2', 3'-ジデオキシ-5-(3-アミノプロピン-1-イル)UTP	終濃度 0.5 M
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TOYOBO 製 日本)	50 units
10x 反応バッファー (TOYOBO 製 日本)	5 μ l

反応容量 50 μ l で 37°C60 分間インキュベートした。

反応後、フェノール処理、エタノール沈殿を行い 3' 末アミノ化 TSH β cDNA、0.5 μ g を得た。

つぎに、

3' 末アミノ化 TSH β DNA 0.5 μ g

無水こはく酸 終濃度 5%

容量 10 μ l で反応し、これにより、3' 末にカルボキシル基を導入した DNA とした。この溶液は混和後、即座に後記の基板への結合反応に用いた。

基板はスライドガラスから作製した。スライドガラスを 100% トリフルオロアセテートで室温 1 時間処理後、乾燥させ、さらに 2% APTES (Aminopropyltriethoxy silane、関東化学) 溶液(水:アセトン、50:50)に浸して、室温 1 日処理した。アセトンで 3 回洗浄、アセトニトリルで 1 回洗浄を行い、アミノ化基板とした。

3' 末カルボキシル化 TSH β DNA を、以下のようにしてアミノ化基板上に固定した。すなわち、前記 3' 末カルボキシル TSH β DNA に終濃度 5%になるようにカルボジイミドを混和し、これの 1 μ l をアミノ化基板にドットした。そして 50°C、6 時間インキュベートした後、洗浄液 1 (10mM Tris-Cl [pH 8.0], 1mM EDTA, 0.1% SDS)、0.1N NaOH、洗浄液 2 (10mM Tris-Cl [pH 8.0], 1mM EDTA) で順次洗浄した。これにより、基板上に固定化された一本鎖 DNA を得た。

実施例 2

MutS-GFP 融合タンパク質発現プラスミドの構築を図 1 に示す。

まず、大腸菌 DH5 α (ライフテックオリエンタル社製、米国) の MutS 遺伝子 (Schlensog, V. and Boeck, A., J. Bacteriol. 173, 7414-7415 (1991)) を PCR で増幅した。上流プライマーには、開始コドン周辺の配列を改変し、XhoI 部位を持たせた ttg gta ctc gag atg agt gca ata gaa aat ttc gac、下流プライマーには AccI 部位を持たせるように改変した cga cgt tgt cga cac cag gct ctt caa gcg ata aat を用いた。増幅した DNA フラグメントは XhoI、AccI で消化した後、pEGFP-N1 (CLONETECH 社製、

米国)に連結し、MutS-GFP とし、DH10B (ライフテックオリエンタル社製、米国)に導入して増殖させた。

次に、DH10 α から回収した MutS-GFP を NotI, XhoI (日本ジーン社製、日本)で消化して、pThioHisB (Invitrogen 社製、オランダ)の NotI, XhoI に連結し、HP-Thio-MutS-GFP を構築した。

これを発現用宿主大腸菌 TOP10 (Invitrogen 社製、オランダ)に導入し、LB 培地中 25°C で培養し、IPTG を加えて、融合タンパク質の発現を誘導し、培養した後集菌した。この菌体を超音波破碎し、10000g で遠心した上清を可溶性画分とした。

この可溶性画分を抗チオレドキシン抗体を用いたウェスタンブロッティングにかけたところ十分量の融合タンパク質が発現していることが確認できた。

得られた可溶性画分を ProBond カラム (Invitrogen 社製、オランダ)を用いて同社のプロトコールに従って精製し、精製物をエンテロキナーゼで処理により HP チオレドキシン部分と MutS-GFP 部分を切り離した。これを SDS 電気泳動にかけ、130kDa のバンドを切り出し、さらにリナチュレーションして MutS-GFP 融合タンパク質とした。

実施例 3

実施例 1 で作製した DNA チップを、非特異的ハイブリダイゼーションを無くすため、70mM 無水コハク酸、0.1M ほう酸、pH8.0、35% 1-メチル-2-ピロリジノン溶液で処理した。³²P でラベルした TSH β ダブルストランド cDNA (Hayashizaki, Y. et al. FEBS Lett. 188 (1985) 394-400) 0.1 μ g を 4 μ g poly(dA) (シグマ社製、米国)、2.5 μ g 大腸菌 tRNA (シグマ社製、米国)、4 μ g マウス CotI DNA (ライフテックオリエンタル社製、米国)、0.3 μ l 10%SDS を含んだ 11 μ l 3.5xSSC に溶解し、2 分間煮沸させた後室温で冷ました。ハイブリダイゼーションは 62°C の温水浴中で 14 時間行った。終了後、2xSSC、0.2%SDS で 5 分間、0.2xSSC で 1 分間洗浄した。これ

に実施例 2 で調整した MutS-GFP 融合タンパク質 1 ナノモル、0.02M KPO_4 , pH7.4, 0.05M KCl, 0.1mM EDTA, 1mM ジチオスレイトール, 0.01%BSA を反応させ、37℃で 1 時間インキュベートした。0.02M KPO_4 , pH7.4, 0.05M KCl, 0.1mM EDTA, 1mM ジチオスレイトール, 0.01%BSA で洗浄後、蛍光顕微鏡下で MutS-GFP 融合タンパク質が結合しているかどうか判定した。その後、DNA チップのオートラジオグラフィーをとり、ラベルした cDNA がハイブリダイゼーションしているかどうかの判定を行った。結果を図 2 に示す。

請求の範囲

- (1) (A) 1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上のPNA断片からなる群から選ばれる1種または2種以上の断片を固定した基板上の前記断片の少なくとも1つと、1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上のPNA断片からなる群から選ばれる少なくとも1種の変異を検定すべき断片とをハイブリダイズさせる工程、
- (B) ハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識された物質を結合させる工程、
- (C) 前記物質が結合した断片を、前記標識を検出することにより同定する工程を含む、変異を有する核酸及び／又はPNA断片を検出する方法。
- (2) 不適正塩基対に特異的に結合する物質が、ミスマッチ結合タンパク質である請求項1記載の方法。
- (3) ミスマッチ結合タンパク質がMut Sタンパク質若しくはその類似体またはC／Cミスマッチ結合タンパク質である請求項2記載の方法。
- (4) 不適正塩基対に特異的に結合する物質が、発光タンパク質、リン光タンパク質、蛍光タンパク質、発光物質、蛍光物質、リン光物質、放射性物質、安定同位元素、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質で標識されている請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- (5) 不適正塩基対に特異的に結合する物質が、GFP (Green Fluorescence Protein)で標識されている請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- (6) 変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片が標識されており、かつ変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片の標識を検出することにより、不適正塩基対を生じた断片の同定と定量とを行う請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

(7) 変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片に導入された標識が、不適正塩基対に特異的に結合する物質の標識とは、得られるシグナルが異なり、不適正塩基対を生じた断片の同定と定量とを並行して行う請求項6に記載の方法。

(8) 変異を検定すべき核酸及び／又はPNAが、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質で標識されている請求項6または7に記載の方法。

(9) (A) 1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上のPNA断片からなる群から選ばれる1種または2種以上の断片を固定した基板上的前記断片の少なくとも1つと、1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上のPNA断片からなる群から選ばれる少なくとも1種の変異を検定すべき断片とをハイブリダイズさせる工程、

(D) ハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対を特異的に認識切断する物質を作用させて、不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片を切断するか、または不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片の一方の断片の少なくとも一部を切除する工程、

(E) 切断または切除後に基板上に残った断片を標識する工程、

(F) 標識された断片を、前記標識を検出することにより同定する工程

を含む、変異を有する核酸及び／又はPNA断片を検出する方法。

(10) 基板上に固定された断片の3'末端がブロックされており、かつ工程(E)における断片の標識を3'付加反応により行う請求項9記載の方法。

(11) 不適正塩基対を特異的に認識切断する物質が、ヌクレアーゼである請求項9または10記載の方法。

(12) ヌクレアーゼが、S1ヌクレアーゼ、マングビーン(Mung bean)ヌクレアーゼまたはRNase Hである請求項11記載の方法。

(13) 工程(E)における、断片の標識を、標識された基質を用いた酵素反応により行う請求項9～12のいずれか1項に記載の方法。

(14) 酵素反応がポリメラーゼ反応、カイネーション反応、ライゲーシオン反応、または3'付加反応である請求項13に記載の方法。

(15) 基質が、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質で標識されている請求項13または14に記載の方法。

(16) 変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片が標識されており、かつ変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片の標識を検出することにより、不適正塩基対を生じた断片の同定と定量とを行う請求項9～15のいずれか1項に記載の方法。

(17) 変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片に導入された標識が、工程(E)において断片に付与される標識とは、得られるシグナルが異なり、不適正塩基対を生じた断片の同定と定量とを並行して行う請求項16に記載の方法。

(18) 変異を検定すべき核酸及び／又はPNAが、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質で標識されている請求項16または17に記載の方法。

(19) 基板上に固定された核酸またはPNAの断片は、その5'または3'端においてのみ結合している請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

(20) 基板上に固定された核酸またはPNA断片が共有結合により基板上に固定している請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

(21) 基板上に固定した核酸またはPNAの断片が、cDNAの配列を有する断片である請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

(22) 基板上に固定した核酸またはPNAの断片が、遺伝子完全長のcDNAの一部または全部の配列を有する請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

(23) 不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識されていることを特徴とする物質。

(24) 不適正塩基対に特異的に結合する物質が、ミスマッチ結合タンパク質である請求項23記載の物質。

(25) ミスマッチ結合タンパク質がMut Sタンパク質若しくはその類似体またはC/Cミスマッチ結合タンパク質である請求項24記載の物質。

(26) 標識が、GFP (Green Fluorescence Protein) で標識されている請求項23～25のいずれか1項に記載の物質。

(27) 標識が、発光タンパク質、リン光タンパク質、蛍光タンパク質、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質である請求項21～26のいずれか1項に記載の物質。

(28) 基板の表面に1種又は2種以上のRNA断片又はPNA断片をハイブリダイゼーション可能な状態で固定したことを特徴とする物品。

(29) 基板に固定されたRNA断片又はPNA断片は、その5'または3'端においてのみ基板と結合している請求項28に記載の物品。

(30) 基板に固定されたRNA断片又はPNA断片が共有結合により基板に固定している請求項28または29に記載の物品。



図 1

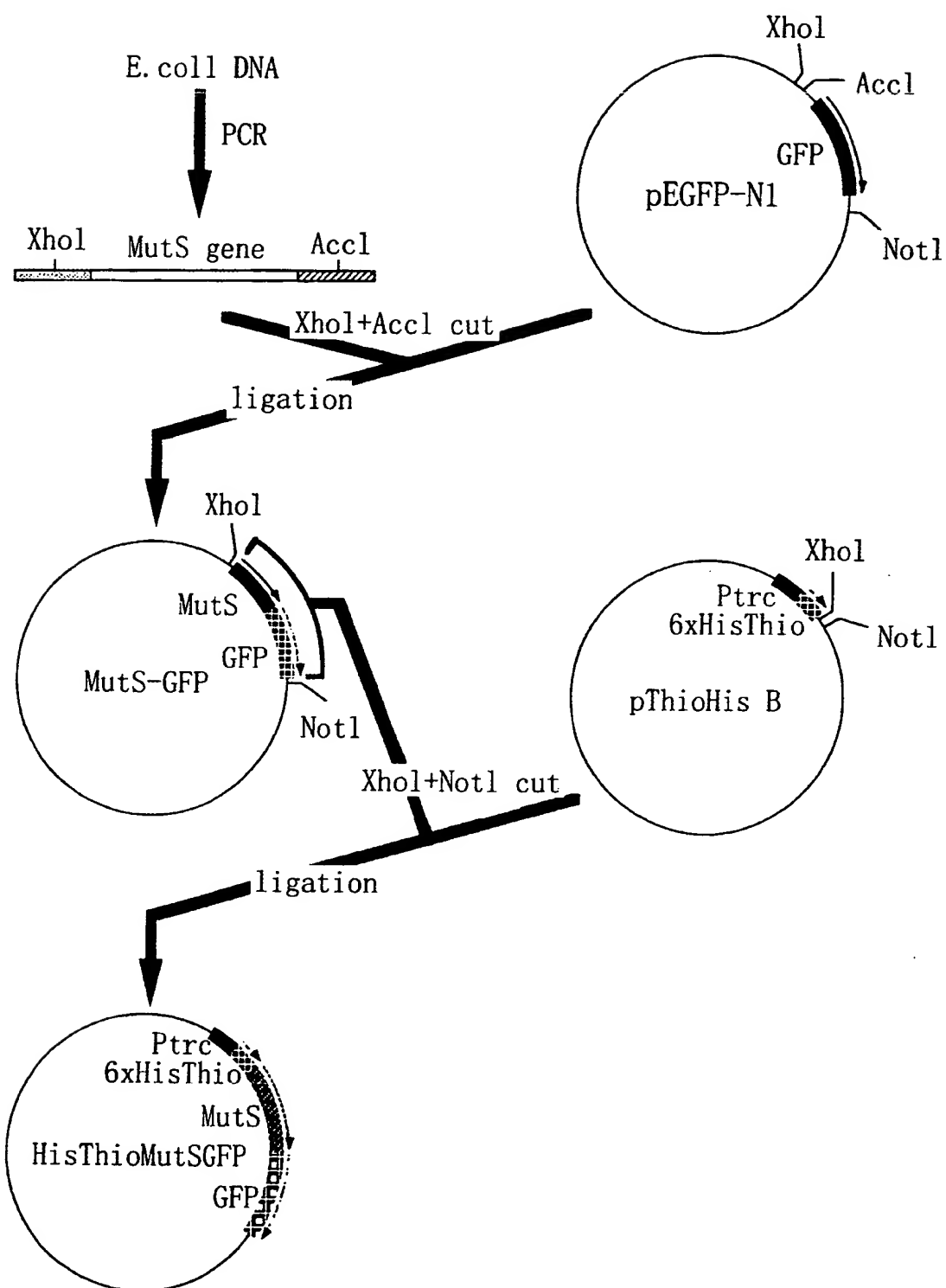
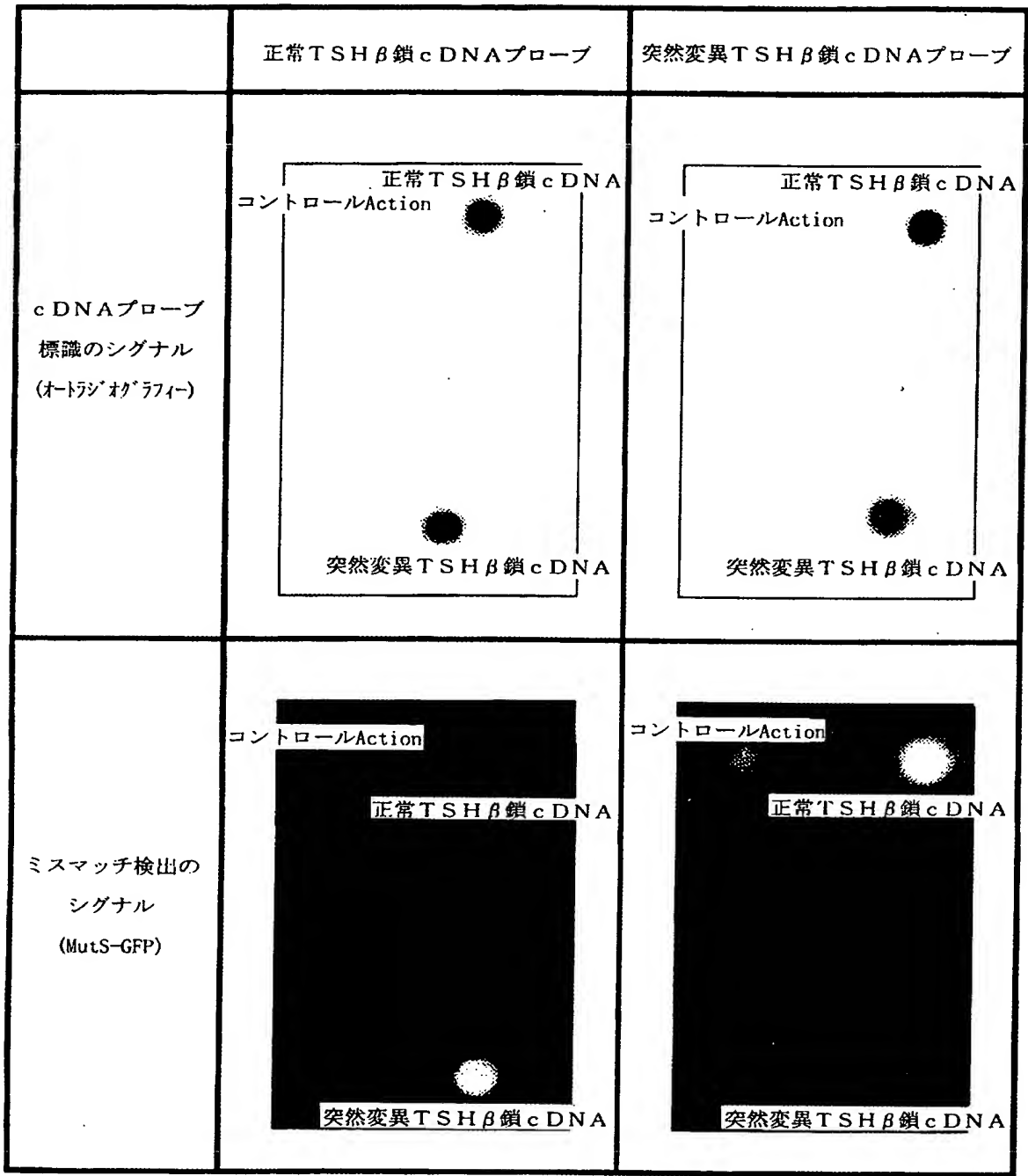




図 2





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03413

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12Q1/68, C12N15/11, C12M1/32, G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12Q1/68, C12N15/11-15/62, C12M1/00-1/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	JP, 7-500493, A (Upstate Biotechnology, Inc.), 19 January, 1995 (19. 01. 95) & WO, 93/02116, A1 & EP, 596028, A1	1-4, 19-25, 27/5, 26/ 6-18, 28-30
X/Y/A	JP, 7-327698, A (SRL Inc.), 19 December, 1995 (19. 12. 95) (Family: none)	1-4, 19-25, 27/5, 26/ 6-18, 28-30
P, X	WO, 97/45555, A1 (PHARMACIA BIOTECH AB), 4 December, 1997 (04. 12. 97) (Family: none)	1-4, 19-25, 27
Y	Science, Volume 263, issued 11 February 1994, Martin Chalfie et al., "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression", pages 802-805	5, 26
A	Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume 51, issued 1986, R.M. Myers and T. Maniatis, "Recent Advances in the Development of Methods for Detecting Single-base Substitutions Associated with Human Genetic Diseases", pages 275-284	9-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
27 October, 1998 (27. 10. 98)Date of mailing of the international search report
10 November, 1998 (10. 11. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03413

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Genomics, Volume 14, issued 1992, A-Lien Lu and Ih-Chang Hsu, "Detection of Single DNA Base Mutations with Mismatch Repair Enzymes", pages 249-255	9-22
A	Science, Volume 236, issued 17 April 1987, Richard A. Gibbs and C. Thomas Caskey, "Identification and Localization of Mutations at the Lesch-Nyhan Locus by Ribonuclease A Cleavage", pages 303-305	9-22
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Volume 93, issued October 1996, Mark Schena et al., "Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes", pages 10614-10619	28-30
Y	JP, 60-61594, A (Joel Proesler et al.), 9 April, 1985 (09. 04. 85) (Family: none)	28-30
A	JP, 9-504699, A (Gene Check, Inc.), 13 May, 1997 (13. 05. 97) & WO, 95/12689, A1 & EP, 733126, A1	1-30
A	WO, 95/29258, A1 (ST. JAMES' AND SEACROFT UNIVERSITY HOSPITALS NHS TRUST), 2 November, 1995 (02. 11. 95) & EP, 758402, A1	1-30
A	Mutation Research, Volume 374, Number 2, issued 21 March 1997, Barbara L. Parsons and Robert H. Heflich, "Evaluation of MutS as a tool for direct measurement of point mutations in genomic DNA", pages 277-285	1-30

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl^o C12Q1/68, C12N15/11, C12M1/32, G01N33/58

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl^o C12Q1/68, C12N15/11-15/62, C12M1/00-1/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	JP, 7-500493, A (アプステイト・バイオテクノロジー・インコーポレーテッド) 19.1月.1995 (19.01.95) & WO, 93/02116, A1 & EP, 596028, A1	1-4, 19-25, 27/ 5, 26/ 6-18, 28-30
X/Y/A	JP, 7-327698, A (株式会社エスアールエル) 19.12月.1995 (19.12.95), (ファミリーなし)	1-4, 19-25, 27/ 5, 26/ 6-18, 28-30
P, X	WO, 97/45555, A1 (PHARMACIA BIOTECH AB) 4.12月.1997 (04.12.97), (ファミリーなし)	1-4, 19-25, 27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 10. 98

国際調査報告の発送日

10.11.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4 B

8 2 1 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Science, Volume 263, issued 11 February 1994, Martin Chalfie et al., "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression", pages 802-805	5, 26
A	Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume 51, issued 1986, R.M. Myers and T. Maniatis, "Recent Advances in the Development of Methods for Detecting Single-base Substitutions Associated with Human Genetic Diseases", pages 275-284	9-22
A	Genomics, Volume 14, issued 1992, A-Lien Lu and Ih-Chang Hsu, "Detection of Single DNA Base Mutations with Mismatch Repair Enzymes", pages 249-255	9-22
A	Science, Volume 236, issued 17 April 1987, Richard A. Gibbs and C. Thomas Caskey, "Identification and Localization of Mutations at the Lesch-Nyhan Locus by Ribonuclease A Cleavage", pages 303-305	9-22
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Volume 93, issued October 1996, Mark Schena et al., "Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes", pages 10614-10619	28-30
Y	JP, 60-61594, A (ジヨエル ブレスラ 外2名) 9.4月.1985 (09.04.85), (ファミリーなし)	28-30
A	JP, 9-504699, A (ジーン チェック、インク) 13.5月.1997 (13.05.97) & WO, 95/12689, A1 & EP, 733126, A1	1-30
A	WO, 95/29258, A1 (ST. JAMES' AND SEACROFT UNIVERSITY HOSPITALS NHS TRUST) 2.11月.1995 (02.11.95) & EP, 758402, A1	1-30
A	Mutation Research, Volume 374, Number 2, issued 21 March 1997, Barbara L. Parsons and Robert H. Heflich, "Evaluation of MutS as a tool for direct measurement of point mutations in genomic DNA", pages 277-285	1-30